

都市環境の水生糸状菌類

細矢 剛

国立科学博物館植物研究部 〒305-0005 茨城県つくば市天久保4-1-1
E-mail: hosoya@kahaku.go.jp

Aquatic Hyphomycetes in the Urban Green Areas

Tsuyoshi Hosoya

Department of Botany, National Museum of Nature and Science,
4-1-1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-0005, Japan
E-mail: hosoya@kahaku.go.jp

Abstract. Aquatic hyphomycetes are mainly asexual ascomycetous fungi with characteristic conidial morphologies adapted to aquatic environments. Since the diversity in urban green areas remains understudied, we surveyed aquatic hyphomycetes in two protected urban areas: the Imperial Palace grounds in Tokyo and the Tsukuba Botanical Garden (Ibaraki Pref.). Water foam samples were collected from freshwater habitats and used for morphological observation and fungal isolation. A total of 24 isolates were obtained and identified using ITS-5.8S sequencing and BLAST analysis for molecular identification. Overall diversity was low, with little species overlapping between the two sites, suggesting that even conserved urban environments harbor limited biodiversity in aquatic hyphomycetes. Some cosmopolitan species found in earlier urban studies were also detected, reflecting their broad distribution. Most isolates belonged to genera such as *Ammiculicola*, *Alatospora*, and *Tetracladium*. Molecular identification revealed some taxonomic ambiguities, especially within *Ammiculicola* species.

Keywords: *Ammiculicola*, aquatic hyphomycetes, mycobiota, taxonomy, urban environment.

はじめに

水生糸状菌類 aquatic hyphomycetes (水生糸状菌類) は主に子囊菌類の無性生殖時代で、S字形やテトラポッド形などの特徴的な形態の胞子を形成することで特徴づけられる。これらの形態は水圏に生じた水泡にトラップされる水中生活に対する適応と考えられている。水生糸状菌類の大部分は子囊菌類の無性生殖時代であり、一部に担子菌類の無性生殖時代も含まれる。生態学的には水中の落葉などの分解を担うとされている (Danger *et al.*, 2016)。

水生糸状菌は、世界でおよそ300種が知られ、日本にも研究例がある (たとえば Miura, 1974)。水

生糸状菌は、都市環境の水圏からも報告されているが (加藤・犀川, 2006)、自然な植生が維持された都市環境の代表的な例といえる皇居や筑波実験植物園で調査されたことはない。自然度の高さとこれらの菌相の多様性との間にどのような関係があるか、興味深い。

過去のほとんどの水生糸状菌相に関する研究では、水泡が採取・固定され、その中に含まれる胞子の形態から種同定が行われてきた (Miura, 1974)。この方法では、一回のサンプリングによって複数種を得ることができる。しかし、DNA解析のためには、培養が必要である。ところが、水生糸状菌の胞子は数時間で発芽してしまうため、培養を得るためには、サンプルを採取後、速やかに

分類培養に供する必要がある。

皇居吹上御苑内には、滝、小川、池など様々な水生環境が存在し、それらから水泡サンプルが得られることが期待される。筑波実験植物園においても、園内に人工的な小川を含む同様の環境が認められる。本研究では、皇居および筑波実験植物園における水生糸状菌の多様性を明らかにすることを目的として、水泡サンプリングに基づき、形態観察およびDNAバーコード配列を用いた分子生物学的方法による同定を試みた。

材料および方法

調査は皇居内の滝、小川、池で2ヶ月に1回実施した。泡の発生は環境によっては稀であるため、筑波実験植物園では不定期な訪問によって園内の水流を観察し、可能な限り水泡を採取した。水泡は目視で確認し、台所用の柄杓で採取した。各サンプルの一部を10%ホルマリン（推定最終濃度）で固定し、残りは氷上に保存して直ちに実験室に運んだ。

分離時に対物10倍・接眼10倍のレンズで形態を確認し、分離にはSkerman式マイクロマニプレーター (Skerman, 1968) を用い、ポテトデキストロース寒天培地 (PDA, 島津ダイアグノスティックス) で培養して培養株を得た。

培養株は2%麦芽エキス培地にて培養した後、Hosaka and Castellano (2008) に従い、DNA抽出、PCR、塩基配列決定を行った。プライマーはITS1FおよびITS4 (White *et al.*, 1990) を用い、PCRおよびシーケンスの条件は、Itagaki and Hosoya (2022) に従った。

得られたシーケンスをもとに、NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)にてBasic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索を行った。

固定したサンプルはコットンブルー乳酸 (CB/LA) をマウント液として用い、観察した。

得られた分離株はNITEナショナルバイオリソースセンター (NBRC) に寄託した。

結果と考察

皇居では2023年3月29日と2024年8月9日、白鳥堀下流にて、筑波実験植物園では2022年5月2日に砂礫地区付近の水流に水泡が観測されたが、ほとんどの調査で水泡は観察されなかった。固定

されたサンプル内の水生糸状菌には一定の生物多様性が認められたが (図1)、いずれのサンプルも水生糸状菌の分生子は少なく、分離に失敗したのもあったため、分離株には生物多様性が十分反映されていないと考えられる。得られた分離株は合計24株 (皇居10株、筑波実験植物園14株) であった。いずれの場所でも、糸状分生子と四射形分生子が大部分を占めていた (表1, 2)。このいずれの形の分生子も収斂進化を示すため、分子レベルでの同定が重要であった。

BLAST 検索では、比較的高い配列類似度で複数の種名が得られたため、最上位の候補のみを示し、その他の種名は類似度98%以上の上位5位内に記載された場合のみ示した (表1)。

両地点ともに、生物多様性が高いとはいえず、共通種も少ないようにみえる (表2)。この結果は、皇居や筑波実験植物園のような保全された地域であっても、水生糸状菌のような生物の生物多様性は低いものと示唆されるが、サンプル数が少ないので、今後の検討が必要である。また、都会の水生糸状菌を扱った加藤・犀川 (2006) の報告とも共通の菌が見出されているが (*Alatospora acuminata*, *Lunulospora cymbiformis*)、これらは自然度の高い環境でも普通に見られる種であり、汎分布性を反映していると考えられる。

Amniculicola Y. Zhang *ter* & K.D. Hyde 属には、複数のITS-5.8Sのパターンが認められた。これらの株の間の類似度は98%前後で、別種とするには微妙な差異であった。本属は、*A. lignicola* Y. Zhang *ter* & K.D. Hyde をタイプ種として、Zhang *et al.* (2008) によって設立された水生子嚢菌 (有性時代をもとにしている) であり、当初3種 (*A. immersa* Yin. Zhang, J. Fourn., Crous & K.D. Hyde; *A. lignicola* (タイプ); *A. parva* Yin. Zhang, J. Fourn., Crous & K.D. Hyde) を含んだ。一方、*Amniculicola* とよく似たS字型の分生子を形成する先行属である *Anguillospora* Ingold 1942 のタイプ種である *A. longissima* は、系統学的解析において *Amniculicola* の3種とグループを形成したため (Zhang *et al.*, 2009; Shearer *et al.*, 2009), Rossmann *et al.* (2016) は *Amniculicola* を保存名とすることを提唱し、*Anguillospora longissima* (Sacc. & P. Syd.) Ingold (bas. *Fusarium longissimum* Sacc. & P. Syd.) を *Amniculicola* に移した。その後、Zhang and Hyde (2019) は *Amniculicola longissima* (Sacc. & P. Syd.) Nadeeshan & K.D. Hyde の有性時代を記載したが、このとき、なぜか無性時代には

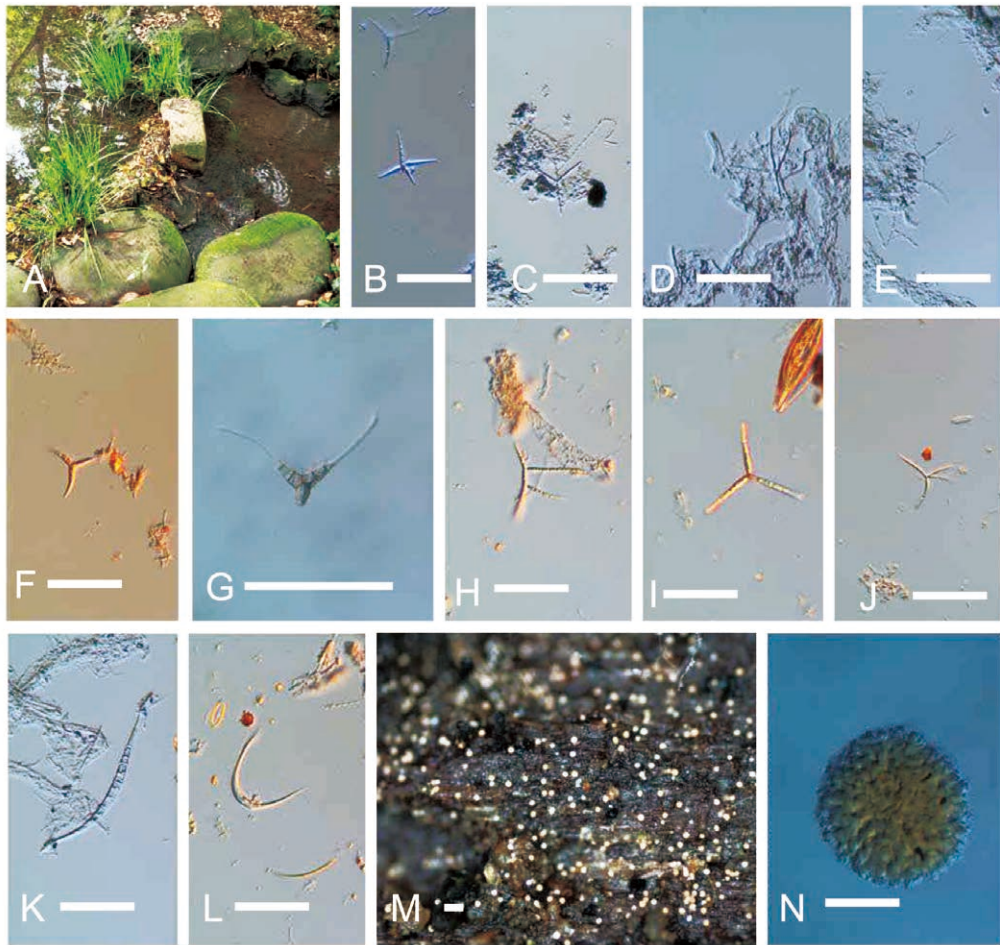


図1. 皇居吹上御苑の水生糸状菌類。A. 採集地の様子（白鳥堀下流）。B. *Triscelophorus acuminatus*. C. *Lemnioniera filiformis*. D. *Tetracladium breve*. E. *Heliscus tentaculatus*. F. *Ceratosporium* (?) sp. G. *Diplocladiella* sp. H. *Tricladium splendens*. I. *Lemnioniera* sp. J. *Alatospora acuminata*. K. Unidentified. L. *Lunulospora cymbiformis*. M. *Brocchiosphaera brocchiata* (fresh specimen). N. *Brocchiosphaera brocchiata*. Scales: B-I, N = 50 μ m. M = 0.1 mm.

言及しなかった (Hyde *et al.*, 2019: 13). *Amniculicola guttulata* Z.L. Luo, K.D. Hyde & H.Y. Su は Hyde *et al.* (2019) で記載された種である。彼らの LSU, SSU, TEF1 の複合データに基づく分子系統解析では、*Amniculicola* は他の分類群とは別に高度に支持されたクレードを形成していたが、*A. guttulata* と *A. longissima* は系統樹上ではよく分かれていなかった。また、他の *Amniculicola* の種も BLAST 結果では上位に複数種が混在する (表1)。これらは、バーコーディング領域 (ITS-5.8S) のみからでは識別が不可能であると思われ、種としての独立性を認めずに統合するか、タンパク質遺伝子などの補助領

域による精査によって、別分類群と認識することが妥当である。また、*Amniculicola* は日本各地に分布し、本研究でも皇居・筑波実験植物園ばかりでなく、他の地域でも得られている。未記載種が含まれている可能性もあるため、さらにサンプル数を増やした上での検討が必要である。表2ではこのような事情から、種レベルの同定を保留し、複数種をまとめて表現した。

Alatospora, *Tetracladium* にも同様の傾向があり、近年では最も広範囲に分布するとされてきた *A. acuminata* が複数種に分かれる可能性が指摘されており、*Tetracladium* についても種レベルの再検討

表1. 皇居および筑波実験植物園で得られた水生糸状菌の分子同定結果

採集地	菌株番号	菌名	TotalScore	QueryCover	Per. Ident.	Accession	上位5種内の他の種
皇居	9593	<i>Amniculicola guttulata</i>	874	94	98.2	MT627726	<i>A. longissima</i>
皇居	9594	<i>Amniculicola longissima</i>	880	98	96.79	MK353142	<i>A. guttulata</i>
皇居	9595	<i>Lemonnieria pseudofloscula</i>	1439	97	96.87	OM907742	<i>Margaritispora aquatica</i> ; <i>L. terrestris</i>
皇居	9596	<i>Margaritispora aquatica</i>	997	100	99.45	MK353139	<i>Lemonnieria terrestris</i>
皇居	9597	<i>Tetracladium breve</i>	1026	100	98.2	MK371730	<i>T. marchalianum</i>
皇居	9598	<i>Amniculicola guttulata</i>	870	96	98.2	MT627726	<i>A. longissima</i>
皇居	9599	<i>Tetracladium breve</i>	1022	100	99.82	MK371730	<i>T. marchalianum</i>
皇居	9600	<i>Amniculicola guttulata</i>	874	94	98.2	MT627726	<i>A. longissima</i>
皇居	9621	<i>Brochiosphaera brocchiata</i>	957	96	99.88	LC332983	
皇居	9962	<i>Triscelophorus cf. acuminatus</i>	1050	93	100	KF730835	<i>T. monosporus</i>
植物園	10561	<i>Amniculicola longissima</i>	1012	100	99.24	MK353142	<i>A. lignicola</i>
植物園	10562	<i>Amniculicola guttulata</i>	918	90	99.8	MT627726	<i>A. lignicola</i>
植物園	10563	<i>Trichomerium sp.</i>	931	80	97.96	PQ871491	Chaetothyriales sp.
植物園	10564	<i>Amniculicola longissima</i>	1019	100	99.24	MK353142	<i>A. lignicola</i>
植物園	10565	<i>Tetracladium marchalianum</i>	1064	100	100	MH930823	
植物園	10566	<i>Amniculicola parva</i>	1589	99	95.93	MH863272	<i>A. longissima</i>
植物園	10568	<i>Amniculicola parva</i>	1607	99	96.33	MH863272	<i>A. longissima</i>
植物園	10569	<i>Amniculicola guttulata</i>	918	91	99.8	MT627726	<i>A. longissima</i> , <i>A. lignicola</i>
植物園	10570	<i>Amniculicola longissima</i>	1023	100	99.24	MK353142	<i>A. lignicola</i>
植物園	10571	<i>Alatospora pulchella</i>	1059	99	99.83	KC834039	<i>A. acuminata</i>
植物園	10573	<i>Amniculicola guttulata</i>	918	91	99.8	MT627726	
植物園	10574	<i>Alatospora pulchella</i>	1050	99	99.48	KC834039	<i>A. acuminata</i>
植物園	10576	<i>Amniculicola guttulata</i>	918	90	99.8	MT627726	<i>A. longissima</i> , <i>A. lignicola</i>
植物園	10577	<i>Alatospora pulchella</i>	1044	98	99.82	KC834039	<i>A. acuminata</i>

それぞれのDNAバーコード領域をもとにBLAST検索を行い、E=0で最上位でヒットしたものと、上位5種内の他の種。*Amniculicola*の3種(*A. longissima*, *A. guttulata*, *A. lignicola*)は極めて近い位置づけであることが示唆される)

表2. 皇居および筑波実験植物園で得られた水生糸状菌

菌名*	皇居	筑波実験植物園	検出**
<i>Alatospora</i> spp. (<i>acuminata</i> , <i>pulchella</i>)	●	●	固・培
<i>Amniculicola</i> spp. (<i>guttulata</i> , <i>longissima</i> , <i>parva</i>)	●	●	培
<i>Brochiosphaera brocchiata</i>	●		培
<i>Ceratosporium</i> sp.	●		固
<i>Diplocladiella</i> sp.	●		固
<i>Heliscus tentaculatus</i>	●		固
<i>Lemonnieria filiformis</i>	●		固
<i>Lemonnieria</i> sp.	●		固
<i>Lemonnieria pseudofloscula</i>	●		培
<i>Lunulospora cymbiformis</i>	●		固
<i>Margaritispora aquatica</i>	●		培
<i>Tetracladium breve</i>	●		固・培
<i>Tetracladium marchalianum</i>		●	培
<i>Trichomerium</i> sp.		●	培
<i>Tricladium splendens</i>	●		固
<i>Triscelophorus acuminatus</i>	●		固

**Alatospora*, *Amniculicola* においては、複数種が候補となり同定できないため(本文参照)、分子同定上可能性のある種を()内に示した。

** 検出:「固」は固定した泡サンプルからの検出を「培」は培養株による検出を示す。

が必要である。

謝 辞

本報告をまとめるにあたり、調査にご協力いただいた宮内庁庭園課の職員各氏に厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- Danger, M., M. O. Gessner and F. Bärlocher, 2016. Ecological stoichiometry of aquatic fungi: current knowledge and perspectives. *Fungal Ecology*, **19**: 100–111.
- Hosaka, K. and M. A. Castellano, 2008. Molecular phylogenetics of Geastrales with special emphasis on the position of *Sclerogaster*. *Bulletin of the National Science Museum, Series B*, **34**: 161–173.
- Hyde, K. D., D. S. Tennakoon, R. Jeewon, D. J. Bhat, S. S. N. Maharachchikumbura, W. Rossi, M. Leonardi, H. B. Lee, H. Y. Mun, J. Houbraken, T. T. T. Nguyen, S. J. Jeon, J. C. Frisvad, D. N. Wanasinghe, R. Lücking, A. Aptroot, M. E. S. Cáceres, S. C. Karunarathna, S. Hongsanan, R. Phookamsak, N. I. de Silva, K. M. Thambugala, R. S. Jayawardena, I. C. Senanayake, S. Boonmee, J. Chen, Z. L. Luo, C. Phukhamsakda, O. L. Pereira, V. P. Abreu, A. W. C. Rosado, B. Bart, E. Randrianjohany, V. Hofstetter, T. B. Gibertoni, A. M. da Silva Soares, H. L. Plautz, H. M. P. Sotão, W. K. S. Xavier, J. D. P. Bezerra, T. G. L. de Oliveira, C. M. de Souza-Motta, O. M. C. Magalhães, D. Bundhun, D. Harishchandra, I. S. Manawasinghe, W. Dong, S. N. Zhang, D. F. Bao, M. C. Samarakoon, D. Pem, A. Karunarathna, C. G. Lin, J. Yang, R. H. Perera, V. Kumar, S. K. Huang, M. C. Dayarathne, A. H. Ekanayaka, S. C. Jayasiri, Y. Xiao, S. Konta, T. Niskanen, K. Liimatainen, Y. C. Dai, X. H. Ji, X. M. Tian, A. Mešić, S. K. Singh, K. Phutthacharoen, L. Cai, T. Sorvongxay, V. Thiyagaraja, C. Norphanphoun, N. Chaiwan, Y. Z. Lu, H. B. Jiang, J. F. Zhang, P. D. Abeywickrama, J. V. S. Aluthmuhandiram, R. S. Brahmanage, M. Zeng, T. Chethana, D. Wei, M. Réblová, J. Fournier, J. Nekvindová, R. do N. Barbosa, J. E. F. dos Santos, N. T. de Oliveira, G. J. Li, D. Ertz, Q. J. Shang, A. J. L. Phillips, C. H. Kuo, E. Camporesi, T. S. Bulgakov, S. Lumyong, E. B. G. Jones, P. Chomnunti, E. Gentekaki, F. Bungartz, X. Y. Zeng, S. Fryar, Z. Tkalčec, J. Liang, G. Li, T. C. Wen, P. N. Singh, Y. Gafforov, I. Promptutha, E. Yasanthika, I. D. Goonasekara, R. L. Zhao, Q. Zhao, P. M. Kirk, J. K. Liu, J. Y. Yan, P. E. Mortimer, J. Xu and M. Doilom, 2019. Fungal diversity notes 1036–1150: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa. *Fungal Diversity*, **96**: 1–242.
- Itagaki, H. and T. Hosoya, 2022. *Pyrenopeziza orientalipectiolaris* sp. nov. in Japan and morphological and genetic comparison with its relevant species *P. petiolaris* in Europe. *Mycoscience*, **63**: 181–188.
- Miura, K., 1974. Stream spora of Japan. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, **15**: 289–308.
- Rossmann, A. Y., W. C. Allen, U. Braun, L. A. Castlebury, P. Chaverri, P. W. Crous, D. L. Hawksworth, K. D. Hyde, P. Johnston, L. Lombard, M. Romberg, R. A. Samson, K. A. Seifert, J. K. Stone, D. Udayanga and J. F. White, 2016. Overlooked competing asexual and sexually typified generic names of Ascomycota with recommendations for their use or protection. *IMA Fungus*, **7**: 289–308.
- Shearer, C. A., H. A. Raja, A. N. Miller, P. Nelson, K. Tanaka, K. Hirayama, L. Marvanová, K. D. Hyde and Y. Zhang, 2009. The molecular phylogeny of freshwater Dothideomycetes. *Studies in Mycology*, **64**: 145–153.
- Skerman, V. B. D., 1968. A new type of micromanipulator and microforge. *Journal of General Microbiology*, **54**: 287–297.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Cambridge, pp. 315–322.
- Zhang, Y., J. Fournier, P. W. Crous, S. B. Pointing and K. D. Hyde, 2009. Phylogenetic and morphological assessment of two new species of *Ammniculicola* and their allies (Pleosporales). *Persoonia*, **23**: 48–54.
- Zhang, Y., R. Jeewon, J. Fournier and K. D. Hyde, 2008. Multi-gene phylogeny and morphotaxonomy of *Ammniculicola lignicola*: a novel freshwater fungus from France and its relationships to the Pleosporales. *Mycological Research*, **112**: 1186–1194.
- 加藤大輔・犀川政稔, 2006. 都会の湧水や池に生息する水生不完全菌類. 日本菌学会会報, **47**: 17–22.